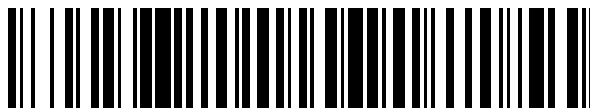


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 491**

21 Número de solicitud: 201330922

51 Int. Cl.:

B82Y 15/00

(2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

20.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2015

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

SERRANO, 117

28006 MADRID ES y

FUNDACIÓN TEKNIKER (50.0%)

72 Inventor/es:

POSTIGO RESA, Pablo Aitor;

ORTIZ DE ELGUEA, Aratz;

JUARROS LASKURAIN, Aritz y

MERINO ÁLVAREZ, Santos

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **DISPOSITIVO PARA LA DETECCIÓN DE UNA ÚNICA MOLÉCULA EN SITUACIÓN DE NANOCONFINAMIENTO Y EN RÉGIMEN DINÁMICO, PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN Y USO**

57 Resumen:

Dispositivo para la detección de una única molécula en situación de nanoconfinamiento y en régimen dinámico, procedimiento de fabricación y uso.

El objeto de la presente invención está relacionado con un dispositivo que integra estructuras de cristal fotónico y micro-nanocanales para la manipulación y detección de moléculas de ADN y otras moléculas con marcadores luminiscentes. El dispositivo, basado en la capacidad de las guías fotónicas de direccionar las ondas electromagnéticas, concentra la señal de emisión de la molécula en respuesta a una señal de excitación en una dirección dada. Son igualmente objetos de la presente invención el procedimiento de fabricación del dispositivo y el uso del mismo para la detección de una única molécula en situación de nanoconfinamiento y en régimen dinámico.

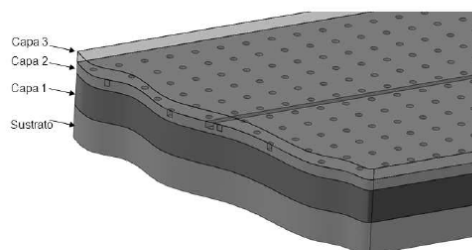


Fig. 1

DISPOSITIVO PARA LA DETECCIÓN DE UNA ÚNICA MOLÉCULA EN SITUACIÓN DE NANOCONFINAMIENTO Y EN RÉGIMEN DINÁMICO, PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN Y USO

DESCRIPCIÓN

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

5 El objeto de la presente invención se enmarca en el sector de la nanofotónica y micro-nanofluídica y está relacionado con un dispositivo que integra estructuras de cristal fotónico y micro-nanocanales para la manipulación y detección de moléculas de ADN y otras moléculas con marcadores luminiscentes. El dispositivo, basado en la capacidad de las guías fotónicas de direccionar las ondas electromagnéticas, concentra la señal de emisión
10 de la molécula en respuesta a una señal de excitación en una dirección dada. Respecto a la invención, hay que destacar su gran nivel de miniaturización que permite diseños con tamaño reducido, la gran capacidad de concentración de la señal que permite su medida con detectores convencionales y su facilidad de fabricación mediante técnicas de alto rendimiento.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

Existen múltiples dispositivos o métodos de sensado para medir de manera rápida y fiable un gran número de parámetros, como por ejemplo, temperatura, presión, intensidad de campo eléctrico, etc. El interés se centra actualmente en el desarrollo de dispositivos o
20 métodos de sensado para la detección, identificación y cuantificación de sustancias, como pueden ser gases, líquidos, proteínas, hormonas, bacterias o ADN, entre muchas otras. Estos dispositivos y métodos de sensado tienen aplicación en infinidad de campos, como por ejemplo, la investigación farmacéutica, el diagnóstico de enfermedades, la detección de contaminantes, o la guerra bacteriológica.

25

El interés en reducir el volumen de los procesos analíticos, combinado con los avances en micro y nanofluídica, están motivando el desarrollo de nuevos chips en los cuales los análisis pueden ser desarrollados más rápidamente y a un coste mucho menor que los tradicionalmente usados en laboratorios de biología molecular. Las nuevas aproximaciones
30 en investigación están motivadas por la posibilidad de observar nuevos fenómenos u obtener información más detallada de sistemas activos biológicamente. Por este motivo, durante los últimos años la comunidad científica ha promovido una clase de investigación centrada en nuevas aproximaciones físicas y químicas al análisis biomolecular. La

complejidad de los procesos de la vida y la riqueza de la biología molecular proporcionan un amplio camino con el estudio de estos nuevos dispositivos. El desarrollo de estos nuevos chips está cambiando la naturaleza de las cuestiones de las que podemos obtener respuestas experimentales a nivel molecular. Estos nuevos chips integran medidas eléctricas, ópticas y físicas combinadas con el guiado de fluidos para crear un nuevo concepto de *biochips* denominados dispositivos para el análisis de una única molécula (*single molecule devices*). En general, estos chips pueden permitir un análisis menos invasivo de fluidos biológicos complejos para diagnóstico médico y terapias avanzadas. Un amplio rango de tecnologías, incluida la fabricación, están siendo direccionadas hacia estos objetivos. El conjunto de herramientas denominadas *lab-on-a-chip* (dispositivo que integra funciones de un laboratorio en un chip), y particularmente, los chips para detección de una única molécula, pueden en el medio y largo plazo proporcionar sistemas funcionales para el diagnóstico de determinadas enfermedades diana y proporcionar sistemas eficientes en el avance de terapias asociadas a enfermedades crónicas.

El desarrollo de chips moleculares en los que interaccionar con las moléculas requiere no únicamente de técnicas de detección ultrasensibles sino que es necesario el control micro y nanofluídico a nivel de chip, integrando canales, celdas, válvulas, electrodos y funcionalización superficial que permita la interacción con moléculas específicas. No menos importante, es el desarrollo de procesos de fabricación que permitan la formación de canales, agujeros o rendijas de dimensiones en la escala de las moléculas que queremos detectar, es decir, en el orden de unos pocos nanómetros. Sin embargo, aunque necesario, esto no es suficiente, y el desarrollo de tecnologías maduras que permitan la fabricación de dispositivos con motivos en esta escala de una forma fiable y económica resulta fundamental para el éxito y llegada a la industria de este nuevo concepto de chip. La combinación exitosa de todos estos factores crea un rango de oportunidades enorme en el campo del análisis molecular.

Los métodos usados en la actualidad para el análisis de ADN son costosos y lentos. Requieren cortar cada molécula en millones de fragmentos, replicar cada segmento, clasificarlos por tamaño y reconstruir la cadena de ADN original. Por el contrario, los métodos basados en información obtenida de una única molécula, como en el estiramiento de ADN, consisten en el estiramiento de moléculas individuales por confinamiento en los canales nanofluídicos, abriendo nuevas posibilidades para el análisis de ADN [F. Persson et al., Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 985–999] y la detección bioquímica, lo que acelera el

proceso y reduce el coste . Paralelamente, M. Wanunu et al. [M. Wanunu et al.. Nature Nanotechnology 5 (2010) 160-165.] detectaron concentraciones de ADN en el rango picomolar, capturando moléculas a través de nanoporos y un gradiente salino, mostrando la posibilidad de detectar ADN sin amplificarlo previamente y con un gran rendimiento en función del tiempo.

El estiramiento de moléculas individuales de ADN en canales nanofluídicos se puede utilizar para el estudio de las propiedades físicas y biológicas de estas moléculas. Estos dispositivos nanofluídicos se han utilizado para mediciones en tiempo real del contorno de las moléculas de ADN estiradas [E. Abad et al.. Microelectronic Engineering 88 (2011) 300-304], estudios de interacción entre proteína y ADN, la organización ordenada usando endonucleasas, la identificación de moléculas individuales de ADN usando nanoranuras, estudios biológicos de conformación, movimiento entrópico y velocidad de moléculas de ADN estiradas en nanocanales [J.T. Mannion et al. Biophys. J. 90 (2006) 4538–4545], y espectroscopia de confinamiento de moléculas individuales de ADN en nanocanales [F. Persson et al., Nano Lett. 9 (4) (2009) 1382–1385].

Por otro lado, la caracterización a gran escala de complejos proteicos requiere generalmente de la separación de complejas muestras de proteínas y la identificación de cada proteína de manera individual. Entre los métodos más utilizados para el análisis de proteínas se encuentra la electroforesis, la espectroscopía de masas y la secuenciación peptídica. Esta metodología es difícil de automatizar y por esta razón, las aproximaciones alternativas de identificación de proteínas como los *microarrays*, que evitan la necesidad de separación de las proteínas, han ganado popularidad en el campo de la proteómica [P. Bertone et al.. Febs J. 272, 21 (2005) 5400-5411]. Sin embargo, incluir proteínas en formato *microarray* supone un reto mucho mayor que incluir moléculas de ADN. La funcionalidad de las proteínas depende del estado de las proteínas, por ejemplo de las modificaciones conformacionales, formación de complejos con otras proteínas, localización subcelular y modificaciones covalente reversibles. Es también importante que en los chips de proteínas en los que se requiere plena funcionalidad de las proteínas sea posible mantenerlas en estado activo a altas densidades.

Paralelamente, los chips basados en detección de una única proteína están obteniendo resultados prometedores. De este modo, la combinación de un nanoporo (2-100 nm) acoplado a un campo eléctrico ha resultado ser una herramienta fundamental para estudiar

translocaciones de proteínas y cambios conformacionales de proteínas [C. Merstorf et al.. ACS Chem. Biol. 7, 652-658 (2012).], o más recientemente, estudiar la presencia de proteínas nativas unidas covalentemente a aptámeros en las proximidades del nanoporo [M. Soskine, et al. Nanolett 12, 4895-4900 (2012).]. El principio de detección se basa en aplicar un campo eléctrico a ambos extremos del nanoporo, el cual separa dos cámaras aisladas, induciendo una corriente iónica a través de un único agujero en la presencia de una solución salina. De este modo, cuando una proteína pasa a través del agujero, induce un decrecimiento en la corriente eléctrica, consecuencia del bloqueo al que da lugar en el paso de iones. Esta señal dependerá de la naturaleza de la proteína y de las características del nanoporo: tamaño, estructura conformacional, carga neta, geometría e interacciones.

En una gran parte de los dispositivos moleculares citados anteriormente se requiere el análisis de la señal de fluorescencia proveniente de una única molécula, bien sea como medida directa de detección molecular o como medida indirecta para estudiar el paso de una molécula a través de un nanoporo o nanocanal aun cuando se detecte una señal eléctrica. En este caso, la detección molecular requiere obtener *ratios* grandes de la señal óptica frente al ruido, lo que requiere de equipamiento avanzado para la recogida de las tenues señales de fluorescencia emitidas por una única molécula individual con su fluoróforo (u otro marcador luminiscente) intercalado. Las cámaras empleadas son de alta sensibilidad, tales como EMCCD (*electron multiplying charged coupled device*).

La integración de estructuras que permitan aumentar la cantidad de luz emitida por el fluoróforo, como por ejemplo un cristal fotónico específicamente diseñado alrededor de las nanoestructuras sensoras, bien sean estas nanocanales o nanoporos, puede dar lugar a una mayor cantidad de luz recibida del fluoróforo circulante en la dirección perpendicular al chip. De este modo, las estructuras fotónicas, adecuadamente diseñadas, pueden reducir la pérdida de luz en el plano del chip y favorecer la emisión del fluoróforo en la dirección o direcciones de detección de la luz, que están definidas por el objetivo o lente utilizados para dicha detección. El uso de estructuras de cristal fotónico alrededor de geometrías con dimensiones nanométricas puede favorecer, mediante la recuperación de la luz emitida por el fluoróforo o marcador luminiscente, la detección de moléculas individuales sin la necesidad de usar sofisticados equipos de detección, facilitando el uso de estos dispositivos para detección en serie de biomoléculas. Además, esta simplificación facilitará su uso no sólo por aspectos económicos, sino también por mayor sencillez de uso y disminución del

tiempo necesario para la detección y para el manejo del chip y el sistema de detección por parte de personal no especializado.

La amplificación de la luz emitida mediante cristales fotónicos ha sido reportada previamente en numerosos trabajos de investigación y patentes. Así por ejemplo la patente US6990259B2 describe un dispositivo biosensor basado en cavidades dispuestas periódicamente en un cristal fotónico. En este caso la detección se realiza mediante la iluminación del cristal fotónico con luz blanca y su posterior medida para obtener el espectro de reflectancia. La patente US7961315B2 describe un método para aumentar la detección de la fluorescencia usando las propiedades de un cristal fotónico para mejorar la extracción de luz. En este caso el cristal fotónico posee resonancias ópticas en el rango de la absorción óptica y de la emisión del fluoróforo para unos determinados ángulos de excitación y de colección de la luz. En dicha patente se utiliza la técnica conocida como "resonancia óptica evanescente" en la cual se usa como fuente de iluminación la luz de un láser que es concentrada en una superficie con periodicidad submicrónica. El cristal fotónico concentra dicha luz y permite una detección de un menor número de eventos sobre la superficie del cristal fotónico, con lo que se consigue aumentar la sensibilidad. El ángulo de iluminación y de detección son críticos en el caso explicado para obtener la mayor cantidad de luz detectada.

El documento de solicitud de patente WO2008123927 hace referencia a un dispositivo con una estructura de capas similar al objeto de la presente invención, pero en el en el cual no existe ningún nanocanal o volumen de confinamiento donde se realice la detección de las moléculas, sino que esta se realiza por adsorción de las moléculas sobre la superficie de TiO_2 . En el caso del dispositivo objeto de la presente invención, la detección de la molécula se realiza en el interior del nanocanal. Esta es por tanto una diferencia fundamental.

Se destaca que ninguna de estas patentes permite la detección de moléculas en movimiento. Además la patente US 6990259B2 precisa de una disposición periódica de cavidades fotónicas (formadas por un arreglo específico de nanoagujeros) en lugar de un cristal fotónico convencional como en el caso de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Constituye un primer objeto de la presente invención un dispositivo para la detección de una única molécula en situación de nanoconfinamiento y en régimen dinámico a través de la

excitación de un emisor unido a la molécula o que forma parte de la misma y que comprende los siguientes elementos:

- un sustrato
- una capa inferior de aislamiento óptico y baja absorción óptica a la longitud de onda de emisión del fluoróforo.
- una capa central formada por un material dieléctrico y baja absorción óptica a la longitud de onda de emisión del fluoróforo.

La capa central del dispositivo presenta al menos una estructura de cristal fotónico y al menos un nanocanal en el cual se confina la molécula a detectar, estando la capa central cubierta por una capa superior de aislamiento óptico que actúa como sello del nanocanal.

El emisor es un fluoróforo, punto cuántico, o molécula fluorescente, y la excitación se produce por iluminación mediante una lámpara de luz blanca o monocromática, preferentemente mediante láser.

En sucesivos modos de realización del dispositivo objeto de la presente invención los elementos que comprende tienen las siguientes características:

- el sustrato que otorga rigidez mecánica al dispositivo se fabrica en un material que se selecciona entre silicio, vidrio o polímero y tiene un grosor comprendido entre 50 μm y 3 mm;
- la capa inferior de aislamiento óptico se fabrica en un material que se selecciona entre sílice o polímero y tiene un grosor comprendido entre 50 nm y 1500 μm ;
- la capa central de material dieléctrico se fabrica en un material que se selecciona entre nitruro de silicio y óxido de titanio y tiene un grosor comprendido entre 30 y 1000 nm;
- la capa central presenta entre 1 y 5000 nanocanales que tienen entre 5 y 2000 μm de longitud, entre 20 y 1000 nm de anchura y entre 20 y 1000 nm de profundidad;
- la capa central presenta entre 1 y 5000 estructuras de cristal fotónico formadas por una red periódica de cavidades de tamaño submicrónico ubicadas en ambos lados de al menos uno de los nanocanales con una simetría que se selecciona entre triangular, cuadrada o mezcla de ambas y un parámetro de red de separación entre las cavidades (a) comprendido entre 10nm y 1000 μm . Las cavidades pueden presentar:
 - geometría cilíndrica coaxial perpendicular a la superficie plana de la capa con un tamaño de radio comprendido entre 10nm y 1000 μm .

- geometría semiesférica con un tamaño de radio comprendido entre 10nm y 1000 μm .
- geometría prismática coaxial perpendicular a la superficie plana de la capa con un tamaño de radio de la circunferencia circunscrita a la base comprendido entre 10nm y 1000 μm ;

- la capa superior sellante de aislamiento óptico se fabrica en un material que se selecciona entre vidrio y polímero, tiene un espesor comprendido entre 100 y 1000 μm , e incluye una capa de un óxido conductor eléctrico transparente u, opcionalmente, incluye un electrodo metálico.

Para la inyección y transporte de fluidos hasta los nanocanales, el dispositivo presenta entre 1 y 100 puertos de entrada y salida, así como entre 1 y 100 microcanales en forma de V, los cuales tienen una anchura comprendida entre 1 y 500 μm y una profundidad comprendida entre 0,5 y 50 μm .

En un modo de realización preferente, los materiales de las distintas capas que conforman el dispositivo se seleccionan en función de la longitud de onda del emisor de forma que:

- el índice de refracción del material utilizado para el sustrato es arbitrario por estar minimizada su influencia sobre la luz emitida;
- el índice de refracción del material utilizado para la capa inferior es $< 1,5$ para la longitud de onda del emisor;
- el índice de refracción del material utilizado para la capa central es $> 1,5$ para la longitud de onda del emisor;
- el material de la capa central presenta en la región espectral del emisor un coeficiente de absorción k en el índice de refracción complejo $n = n + ik$ cuyo valor está comprendido entre 0 y 1.

Opcionalmente puede eliminarse el sustrato que otorga rigidez mecánica al dispositivo.

Constituye otro aspecto de la presente invención un procedimiento de fabricación del dispositivo que comprende:

- una etapa en la que se proporciona un sustrato plano a escala submicrónica con una capa de un material que presenta un coeficiente de absorción k comprendido entre 0 y 1 y un índice de refracción inferior a 1,5 en el rango de longitud de onda del fluoróforo empleado;

- una etapa en la que se proporciona una capa con un coeficiente de absorción k comprendido entre 0 y 1 y un índice de refracción superior a 1,5 en el rango de longitud de onda del fluoróforo empleado;
 - una etapa de formación mediante litografía de nanoimpresión de una red periódica de cavidades de tamaño inferior a la micra sobre la superficie de dicho sustrato y de uno o varios canales para transportar un fluido también de dimensiones submicrónicas;
 - una etapa de deposición de un material transparente, que puede ser conductor o no, sobre dichas cavidades con el fin de sellarlas por su parte superior.
- 10 Finalmente, constituye también un objeto de la presente invención el uso del dispositivo para la detección de una única molécula en situación de nanoconfinamiento y en régimen dinámico que comprende las siguientes etapas:
- introducción del fluido que contiene las moléculas a través de los puertos de entrada del dispositivo;
 - circulación de las moléculas a través de los microcanales mediante presión o campo eléctrico hasta llegar a la zona de entrada a los nanocanales;
 - penetración y difusión de las moléculas en los nanocanales en ausencia de excitación externa;
 - excitación del fluoróforo ligado a las moléculas a través de la iluminación con fuente de luz monocromática o policromática;
 - detección de la emisión del fluoróforo a través de una cámara CCD.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Estructura de capas del dispositivo.

25 **Figura 2:** Diagrama de bandas fotónicas para los modos transversal eléctrico (TE) y transversal magnético (TM) de una guía óptica con un cristal fotónico con simetría triangular de agujeros de sección circular, con un índice efectivo de 1.5 y un radio de agujeros cilíndricos rellenos de aire de 0.3 veces la periodicidad, a .

30 **Figura 3:** Diagrama de bandas para los modos TE y TM para un rango de frecuencias normalizadas cercanas al punto III (entre 0.6 y 1) para el mismo tipo de guía óptica con cristal fotónico, en este caso con un índice efectivo de 1.62 y un radio 0.25a.

Figura 4: Bandas fotónicas en las cercanías del punto III y para el cristal fotónico con índice efectivo $n_{\text{eff}}=1.7$ correspondiente a una guía óptica formada por una capa de SiO_2 de 500nm (primera capa) y otra capa de Si_3N_4 de 170nm de espesor (segunda capa). La tercera capa

está formada por una capa de pírex de espesor infinito en comparación con los espesores anteriores.

Figura 5: Imágenes del dispositivo en diferentes escalas. En el panel a) se muestra una imagen de microscopia óptica (500 aumentos) donde se observan los dos microcanales y los nanocanales situados entre ambos microcanales. El panel b) muestra una imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de la zona de los nanocanales. El panel c) es otra imagen SEM del nanocanal número 2 sin cristal fotónico y del nanocanal número 3 con cristal fotónico a ambos lados. El panel d) es una imagen de microscopia de fuerzas atómicas (AFM) del nanocanal 3 con la estructura de cristal fotónica a ambos lados del mismo.

Figura 6: Imagen del dispositivo con el fluoróforo inyectado tomada a través del software de control de la cámara EMCCD. En la imagen se observa el microcanal receptor y los nanocanales iluminados por el fluido luminiscente que circula entre el microcanal emisor y el receptor.

Figura 7: Representación de la intensidad de luz detectada por la cámara EMCCD en función del número de pixel correspondiente a la línea vertical amarilla. Esta curva posee una forma gaussiana correspondiente aproximadamente a la distribución de luz que proviene principalmente del microcanal donde se inyecta el fluido luminiscente. Sobre esta curva aparecen una serie de picos que coinciden en posición con la presencia de los nanocanales del dispositivo. Los picos de luz se deben a la luz emitida por las moléculas fluorescentes en el interior de los nanocanales, que se superpone a la luz de fondo (*background*) de distribución gaussiana mencionada anteriormente

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente invención, la detección se realiza mediante un dispositivo que permite el movimiento de moléculas a través de un canal de dimensiones submicrónicas, que también puede usarse para el estiramiento de moléculas como ADN. El dispositivo integra una red periódica de motivos, como una red de difracción o una red bidimensional de postes o agujeros, que proporcionan una resonancia óptica que coincide con la longitud de onda de emisión del fluoróforo, punto cuántico o molécula fluorescente que se mueve en el interior del nanocanal. Esta red periódica se dispone alrededor del nanocanal y su función es la de recuperar la luz que el emisor emite lateralmente y que queda confinada por el material en el que el nanocanal está embebido (típicamente un dieléctrico transparente en la longitud de onda del emisor). Esta luz lateralmente emitida se pierde y no puede ser detectada a no ser que se use la geometría periódica descrita en la presente invención. Esta disposición

periódica o cristal fotónico está diseñada específicamente para permitir que la luz confinada en el material en el que está embebido el nanocanal pueda reflejarse para ser recuperada y se emita además en dirección perpendicular al nanocanal y con un bajo ángulo de divergencia en torno a la normal, de forma que pueda contribuir al aumento de la cantidad de luz detectada en la dirección vertical, que en este caso es la usada para la detección. Este diseño está basado en el efecto de “realimentación óptica distribuida” descrito en [H. Kogelnik and C. V. Shank, Appl. Phys. Lett. 18, 152 (1971)]. Este efecto se ha usado para numerosos dispositivos, por ejemplo en láseres de semiconductor comerciales monomodales. El efecto de realimentación óptica distribuida (DFB en inglés) en una dimensión consiste en la generación de uno o varios haces de luz mediante difracción de Bragg, como ocurre por ejemplo en una estructura periódica unidimensional como una red de difracción, y que resulta en un acoplamiento de dos ondas propagantes en dos direcciones opuestas (propagante y contrapropagante). El efecto también existe en dos dimensiones y ha sido utilizado para la fabricación de microláseres mediante cristales fotónicos bidimensionales. En estos dispositivos, y debido a la bidimensionalidad de la estructura periódica, la difracción de Bragg es multidireccional. La presente invención utiliza difracción de Bragg multidireccional (bidimensional) en el plano formado por el chip y que contiene al nanocanal y las estructuras fotónicas especialmente diseñadas para la recuperación de luz.

En el presente caso la excitación del emisor (fluoróforo, punto cuántico o molécula fluorescente) se realiza por iluminación mediante una lámpara de luz blanca o monocromática, o un láser con una energía e intensidad suficiente como para excitar dicha emisión. El emisor puede estar unido a una molécula o ser parte de la misma, que a su vez puede formar parte de un líquido o gas que circule por el nanocanal. El emisor proporciona luz en un rango espectral determinado, típicamente de una anchura de pocos nm. El cristal fotónico que rodea el nanocanal está específicamente diseñado para que proporcione un efecto DFB maximizado en el rango espectral de emisión del emisor, si bien puede proporcionar el efecto también en otros rangos espectrales. El cristal fotónico está formado por una red bidimensional de motivos periódicamente ordenados, como agujeros, cavidades o protuberancias (postes). Las dimensiones de estos motivos y las distancias entre ellos están optimizadas para que se alcance el máximo de efecto DFB y obtener la máxima cantidad de luz difractada en la dirección vertical, perpendicular al nanocanal. Para ello es necesario tener en cuenta la estructura de bandas del cristal fotónico bidimensional fabricado en la lámina de material dieléctrico transparente. Este material dieléctrico

transparente debe de ser de baja o nula absorción óptica en la región espectral de emisión del emisor.

- Las dimensiones de los motivos que forman el cristal fotónico bidimensional, como el radio de los agujeros r y la separación entre los mismos a , en el caso de una red bidimensional de agujeros rellenos por aire, están seleccionadas de acuerdo al diagrama de bandas, calculado para los valores de r y a que hacen que el punto de máximo efecto DFB corresponda a la energía de emisión del emisor. Debido a esta estructura se consigue un reciclado de fotones que de otra forma se perderían dentro del material del que está hecho el dispositivo. Además estos fotones se redirigen en una dirección perpendicular al plano del cristal fotónico, concentrándose muy cerca de la normal al mismo y aumentando la luz en esta dirección. Este aumento de luz es registrado por un sistema de detección como una cámara CCD o similar. Cuanto mayor es el porcentaje de luz recuperada, mayor es el incremento de luz detectada y menor es la sensibilidad necesaria para el sistema detector, o equivalentemente menor es el tiempo necesario para la detección. De esta manera y mediante el dispositivo objeto de la presente invención se puede usar una cámara de detección menos sensible y se puede reducir el tiempo de detección necesario para formar una imagen.
- El dispositivo se compone de una guía óptica formada por tres capas como muestra la Figura 1, que son: una primera capa central (capa 2), de elevado índice de refracción en la longitud de onda de emisión del emisor, una segunda capa inferior de aislamiento óptico o *cladding* (capa 1) y una tercera capa superior de aislamiento óptico o *cladding* que además actúa de sello del nanocanal fabricado en el dispositivo (capa 3). Estas tres capas delgadas se fabrican sobre un sustrato que otorga rigidez mecánica al dispositivo, si bien pueden fabricarse sin sustrato de forma que el dispositivo sea flexible. La capa 2 está formada por un material dieléctrico de baja o nula absorción óptica en el rango espectral de la emisión del emisor, cualquiera que sea el emisor (como un fluoróforo, molécula fluorescente o punto cuántico). En esta capa se fabrica un canal (nanocanal) de dimensiones submicrónicas en el que el emisor se moverá en forma aislada o bien enlazado a una molécula y dentro de un líquido o gas. El índice de refracción del material que compone la capa 2 es, para la longitud de onda de emisión del emisor, mayor que 1 y es el mayor posible mientras se cumplan los requisitos anteriores de baja o nula absorción para la longitud de onda del emisor, de forma que el material ofrezca un elevado confinamiento de la luz emitida por el emisor. La capa 2 está fabricada sobre una segunda capa, capa 1, situada inmediatamente por debajo como

muestra la Figura 1. El material de la capa 1 debe de ser de un índice de refracción inferior al de la capa anterior, para la longitud de onda del emisor, λ . La función de la capa 1 es triple, por un lado debe aumentar el confinamiento de la luz en la primera capa mediante un efecto de reflexión total interna y de aumento del índice efectivo. Por otro lado debe maximizar el aislamiento de la luz emitida por el emisor del material usado como sustrato. Finalmente, si dicho aislamiento no es perfecto, debe ayudar al confinamiento de la luz emitida por el emisor mediante un efecto de reflexión en la dirección cuasinormal. Típicamente el espesor que maximiza este último efecto es de $\lambda/2n$ donde n es el índice de refracción efectivo de la multicapa. El espesor la capa 2 debe ser tal que maximice el valor de n . Las capas 1 y 2 están fabricadas encima de un sustrato con un índice de refracción arbitrario ya que su influencia sobre la luz emitida por el emisor esta minimizada mediante el espesor de la capa 1.

La capa 2 contiene una cavidad de dimensiones submicrónicas (nanocanal) especialmente diseñada para el transporte de fluidos o gases en flujos de 10 fl/s. Además las dimensiones son tales que puede usarse como canal en el que moléculas estiradas de ADN se muevan. En esta capa y rodeando al nanocanal están fabricadas las estructuras de cristal fotónico que permiten el reciclado de fotones mediante el efecto DFB. Estas estructuras de cristal fotónico poseen la misma simetría y se disponen a ambos lados del canal, a una distancia inferior o igual a la distancia entre primeros vecinos del cristal fotónico. Las estructuras pueden estar formadas por motivos de forma arbitraria pero igual entre todos ellos, pudiendo ser cavidades o protuberancias rellenas de un material de índice de refracción diferente al índice de la capa central. Como se ha mencionado el tamaño y separación de estas estructuras ha de ser tal que maximice el efecto DFB.

En la presente invención, el cristal fotónico está formado por una red periódica de agujeros rellenos de aire u otro medio de índice menor que el índice efectivo n , perforados en la capa central. La Figura 2 muestra el diagrama de bandas fotónicas para los modos transversal eléctrico (TE) y transversal magnético (TM) de una guía óptica con un cristal fotónico con simetría triangular de agujeros de sección circular, con un índice efectivo de 1.5 y un radio de agujeros cilíndricos rellenos de aire de 0.3 veces la periodicidad, a .

En los puntos del diagrama de bandas (ver Figura 2) donde las bandas fotónicas se cruzan y se dividen cabe esperar un efecto de resonancia óptica, que ocurre especialmente en los bordes de la zona de Brillouin. En dichos puntos las ondas que se propagan se acoplan e

incrementan significativamente la densidad de modos o estados ópticos. Este acoplamiento es diferente en cada punto de acuerdo a las condiciones de Bragg. En la presente invención se usan los modos transversal eléctrico y transversal magnético (TE y TM), lo que añade un mayor número de modos fotónicos que pueden usarse para la incentivación de la intensidad de emisión por efecto DFB. En el caso de que el emisor sea un pozo cuántico tensado, estos modos TM no contribuyen significativamente pero en el presente caso, el emisor puede ser una molécula o punto cuántico y por tanto los modos TM tienen que ser tenidos en cuenta.

En la Figura 2 el punto I corresponde al acoplamiento de dos ondas únicamente, propagante y contrapropagante, que viajan en direcciones opuestas. Este tipo de acoplamiento es similar al que ocurre en los láseres DFB. Dado que hay 6 direcciones equivalentes del tipo Γ -X, pueden formarse tres tipos de cavidades ópticas resonantes diferentes en tres direcciones diferentes. El punto II en la Figura 2 tiene unas características de acoplamiento únicas que no pueden conseguirse en láseres DFB convencionales, como es el acoplamiento de ondas propagándose en tres direcciones diferentes. La dirección Γ -J existe también en cada una de las seis direcciones posibles de forma que sólo existen dos cavidades resonantes de tipo DFB independientes. La aplicabilidad de este modo es incierta porque la luz se emite en tres direcciones diferentes. El punto III corresponde a un acoplamiento de ondas propagándose en seis direcciones posibles. Esta es la mejor elección posible porque incluye el acoplo dentro del plano en las seis direcciones posibles: a 0° , $\pm 60^\circ$, $\pm 120^\circ$ y 180° . Además la dirección del vector resultante del acoplo es perpendicular al plano del cristal fotónico. En el presente dispositivo este efecto se utiliza para la recuperación de luz emitida en estas seis direcciones del plano formado por el cristal fotónico y el nanocanal. Existen otros puntos a frecuencias más altas donde se da un acoplo multidireccional de ondas. Sin embargo los ángulos de acoplamiento con las direcciones salientes del plano del cristal fotónico no están cerca de la dirección perfectamente normal o cercanos a ésta. Por ejemplo en el punto IV la luz se acopla en un ángulo de salida de 54.7° además de a 90° . Por ello el punto más favorable para obtener un máximo de recuperación de luz debido al efecto DFB es el punto III.

La Figura 3 puede ser usada para definir el rango de energías útil para el dispositivo, ya que idealmente el rango de la energía de emisión del emisor debe quedar dentro del rango de energías definido por el menor y mayor valor de la energía de las bandas para $k=0$, esto es, en el punto Γ , donde se da la emisión vertical, perpendicularmente al plano del cristal

fotónico. En la Figura 3 este rango va entre 0,7 y 0,925, en valor de la frecuencia normalizada. De aquí puede extraerse el valor de r y a para una determinada energía como se explica a continuación. Si la anchura de emisión del emisor está entre longitudes de onda λ_1 y λ_2 , entonces el valor medio es $\lambda_{\text{MAX emisor}} = (\lambda_1 + \lambda_2)/2$ y es típicamente el valor

5 aproximado de la longitud de onda con máxima intensidad de emisión en un emisor lorentziano. En nuestro dispositivo este valor debe coincidir con el valor medio del rango mencionado antes, en la Figura 3 $(0,95+0,7)/2 = 0,825$. Esto implica que el valor óptimo de frecuencia normalizada es 0,825 y de aquí puede extraerse el valor del parámetro de red necesario para fabricar el cristal fotónico, a , ya que $\omega = a / \lambda_{\text{MAX emisor}}$. Con el valor de a se

10 deduce r ya que en el cálculo de bandas $r=0.25$ veces el valor de a .

Todos los modos fotónicos que aparecen en la Figura 3 son susceptibles de radiar verticalmente, mediante el efecto DFB explicado anteriormente, en las energías definidas por el corte de dichos modos con el punto Γ ($k=0$). Por esta razón estos son los modos

15 fotónicos que se utilizan en el dispositivo de la presente invención.

Mediante el cálculo de bandas fotónicas puede obtenerse el parámetro de red, a , que determina la separación entre los agujeros que están situados en la capa delgada que contiene el cristal fotónico y el nanocanal. Esta separación es crítica para la fabricación del

20 nanocanal ya que el nanocanal debe tener una anchura inferior a esta separación. En función de la simetría de la red de cristal fotónico (cuadrada o triangular u otra) la distancia de separación entre el nanocanal y la fila de agujeros más próxima variará. Para un máximo efecto DFB en el nanocanal, la separación entre el nanocanal y los agujeros más cercanos debe ser un múltiplo del valor de a .

Una de las características diferenciales del dispositivo objeto de la presente invención es la combinación de un nanocanal con una estructura de cristal fotónico, dispuesta a ambos

25 lados del mismo y especialmente diseñada para recuperar o reciclar la luz que se emite por el emisor contenido en el nanocanal. En el interior del nanocanal puede moverse un fluido o un gas con emisores luminiscentes, como moléculas fluorescentes o puntos cuánticos, y que

30 permite además el estiramiento de moléculas de elevado interés como ADN u otras biomoléculas. El nanocanal queda integrado dentro de una estructura fotónica que se comporta como una guía óptica de capa delgada con un cristal fotónico específicamente diseñado para recuperar la luz mediante la maximización del efecto DFB en dirección

35 vertical al chip, que es donde tiene lugar la detección. Aproximadamente la mitad de la luz

es difractada en dirección opuesta hacia el sustrato de silicio por la estructura fotónica. Gracias a una adecuada separación entre la primera capa de SiO_2 y el sustrato de silicio, este último puede actuar como un eficiente reflector y recuperar parte de esta luz reflejándola en dirección opuesta. La distancia óptima debe ser un múltiplo de $\lambda_{\text{MAX emisor}} / 2n_{\text{SiO}_2}$ donde n_{SiO_2} es el índice de refracción efectivo del SiO_2 para la longitud de onda del emisor (en este caso, $n_{\text{SiO}_2}=1.47$). Un valor superior al óptimo para esta distancia es admisible sin que el dispositivo pierda una eficiencia significativa.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Para ilustrar el método y el dispositivo de sensado propuestos en esta invención, escogemos la configuración que se representa en la Figura 1. En este caso se ha escogido una red de simetría cuadrada para facilitar la fabricación del nanocanal entre las estructuras de cristal fotónico.

El dispositivo se ha fabricado a partir de una oblea de silicio sobre la que se depositan una capa de óxido de silicio (SiO_2) de 500nm y otra capa de nitruro de silicio (Si_3N_4) de 170nm de espesor, ambas por *PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition)*. Cada dispositivo consta de 4 puertos de entrada y salida para la inyección de los fluidos, y 2 microcanales en forma de V para su transporte hasta la entrada de los nanocanales. Los microcanales, de 200 μm de anchura y 3 μm de profundidad, han sido fabricados a partir de una máscara de acetato por técnicas de fotolitografía y ataques *DRIE (Deep Reactive Ion Etching)*. El dispositivo en este ejemplo contiene un total de 6 nanocanales de 500 μm de longitud, anchura $w = 100\text{nm}$ y profundidad $h = 100\text{nm}$. El canal 1 posee una estructura fotónica en ambos lados con simetría de una red cuadrada y parámetro de red $a=354\text{nm}$, y radio de los agujeros $r=71\text{nm}$. El canal 2 no tiene estructura fotónica. El 3 es igual que el 1 con $a=400\text{nm}$, $r=100\text{nm}$. El 4 posee una estructura fotónica en ambos lados con simetría de una red triangular y parámetro de red $a=447\text{nm}$, $r=89\text{nm}$. El canal 5 no tiene estructura fotónica. El canal 6 posee una estructura fotónica en ambos lados con simetría de una red triangular y parámetro de red $a=467\text{nm}$, $r=93\text{nm}$. El número de periodos de cristal fotónico (filas de agujeros) está entre 4 y 5 en cada lado del nanocanal. Todos los nanocanales y las estructuras fotónicas han sido mecanizados por *FIB (Focused Ion Beam)*. El dispositivo está sellado por pegado anódico con una oblea de pírex de 500 μm de espesor, a la que previamente se han mecanizado 4 agujeros pasantes de diámetro 1mm con un láser de femtosegundo.

En la Figura 4 se observan 8 modos fotónicos de polarización TE y TM que en las cercanías del punto III contribuyen al efecto DFB en el nanocanal y posibilitan la recuperación de luz en la guía óptica y su redireccionamiento en la vertical. El dispositivo consta de una capa de Si_3N_4 de alto índice de refracción $n=2$ para $\lambda=550\text{nm}$ (la longitud de onda de máxima emisión de la molécula luminiscente YOYO-1) sobre una capa de SiO_2 de índice menor que el anterior, y una capa superior de pírrex, normalmente formada por una oblea de pírrex pegada por *wafer-bonding*. Las dos primeras capas están depositadas sobre un sustrato compuesto por una oblea de silicio. Mediante esta disposición se consigue que la luz esté mayormente confinada en la capa de alto índice de refracción, el Si_3N_4 , que es la capa que contiene el nanocanal y el cristal fotónico a ambos lados del nanocanal.

En el experimento de detección de moléculas luminiscentes se introduce en el dispositivo anteriormente descrito el compuesto fluoróforo 46960 Fluka Fluorescein sodium salt (λ_{ex} 490 nm; λ_{em} 514 nm en 0.1 M Tris pH 8.0) por los puertos con ayuda de una jeringa. El compuesto fluoróforo llena los microcanales fácilmente por capilaridad hasta llegar a la entrada de los nanocanales, momento en el que se aplica una presión de 1 bar con una bomba de inyección externa, para que el compuesto fluoróforo atraviese los nanocanales con un caudal aproximado de 10 fl/s. A continuación se coloca el dispositivo sobre la mesa de un microscopio para caracterizar los resultados. El *setup* utilizado consiste en un microscopio de reflexión Zeiss, objetivos de 10x y 50X aumentos, juego de filtros (BP_{exc} 470/40 (HE), FT 495 (HE), BP_{em} 525/50 (HE)) y una cámara EMCCD de alta sensibilidad (Photometrics Evolve). La luz de la lámpara de mercurio del microscopio pasa a través del juego de filtros 38HE e ilumina la zona de los nanocanales y estructuras fotónicas que los rodean en un rango de longitudes de onda $\lambda = 450\text{nm}$ a 490nm , excitando el compuesto fluoróforo que en respuesta emite una señal de excitación con $\lambda = 514\text{nm}$.

En la imagen de la Figura 7 se observa el microcanal receptor y los nanocanales iluminados por el fluido luminiscente que circula entre el microcanal emisor y el receptor. En el interior de la Figura 7 aparece la representación de la intensidad de luz detectada por la cámara EMCCD en función del número de pixel correspondiente a la línea vertical amarilla. Esta curva posee una forma gaussiana correspondiente aproximadamente a la distribución de luz que proviene principalmente del microcanal donde se inyecta el fluido luminiscente. Sobre esta curva aparecen una serie de picos que coinciden en posición con la presencia de los nanocanales del dispositivo. Los picos de luz se deben a la luz emitida por las moléculas fluorescentes en el interior de los nanocanales, que se superpone a la luz de fondo

(*background*) de distribución gaussiana mencionada anteriormente. La Figura 7 muestra varias de estas curvas obtenidas en diferentes secciones paralelas a la línea amarilla de la Figura 6 y por tanto perpendiculares a los nanocanales. Como se observa la intensidad de luz proveniente de los nanocanales 1, 3, 4 y 6, que poseen estructura de cristal fotónico, es mayor que la intensidad de los canales 2 y 5 que no poseen estructura fotónica. La intensidad en los canales con estructura fotónica puede llegar a ser hasta 2,5 veces mayor que la de los nanocanales sin estructura fotónica. Este aumento de la intensidad de luz esta por tanto correlacionado con la presencia de la estructura de cristal. Este aumento de la luz detectada puede aportar beneficios como el uso de una cámara CCD menos sensible o el uso de un tiempo de detección menor.

REIVINDICACIONES

- 1.- Dispositivo para la detección de una única molécula en situación de nanoconfinamiento y en régimen dinámico a través de la excitación de un emisor unido a la molécula o que forma parte de la misma y que comprende los siguientes elementos:
- un sustrato,
 - una capa inferior de aislamiento óptico y baja absorción óptica a la longitud de onda de emisión del fluoróforo,
 - una capa central formada por un material dieléctrico y baja absorción óptica a la longitud de onda de emisión del fluoróforo caracterizado porque la capa central presenta al menos una estructura de cristal fotónico y al menos un nanocanal en el cual se confina la molécula a detectar y porque la capa central está cubierta por una capa superior de aislamiento óptico que actúa como sello del nanocanal.
- 2.- Dispositivo según la reivindicación 2, caracterizado porque el emisor es un fluoróforo, punto cuántico, o molécula fluorescente.
- 3.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la excitación se produce por iluminación mediante una lámpara de luz blanca o monocromática.
- 4.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la excitación se produce mediante láser.
- 5.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el sustrato que otorga rigidez mecánica al dispositivo se fabrica en un material que se selecciona entre silicio, vidrio o polímero y tiene un grosor comprendido entre 50 μm y 3 mm.
- 6.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la capa inferior de aislamiento óptico se fabrica en un material que se selecciona entre sílice o polímero y tiene un grosor comprendido entre 50 nm y 1500 μm .
- 7.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la capa central de material dieléctrico se fabrica en un material que se selecciona entre nitrato de silicio, y óxido de titanio y tiene un grosor comprendido entre 30 y 1000 nm.

8.- Dispositivo según la reivindicación 7, caracterizado porque la capa central presenta entre 1 y 5000 nanocanales que tienen entre 5 y 2000 μm de longitud, entre 20 y 1000 nm de anchura y entre 20 y 1000 nm de profundidad.

9.- Dispositivo según la reivindicación 8, caracterizado porque la capa central presenta entre 1 y 5000 estructuras de cristal fotónico formadas por una red periódica de cavidades de tamaño submicrónico ubicadas en ambos lados de al menos uno de los nanocanales con:

- una simetría que se selecciona entre triangular, cuadrada o mezcla de ambas,
- un parámetro de red de separación entre las cavidades (a) comprendido entre 10nm y 1000 μm .

10.- Dispositivo según la reivindicación 9, caracterizado porque las cavidades presentan geometría cilíndrica coaxial perpendicular a la superficie plana de la capa con un tamaño de radio comprendido entre 10nm y 1000 μm .

11.- Dispositivo según la reivindicación 9, caracterizado porque las cavidades presentan geometría semiesférica con un tamaño de radio comprendido entre 10nm y 1000 μm .

12.- Dispositivo según la reivindicación 9, caracterizado porque las cavidades presentan geometría prismática coaxial perpendicular a la superficie plana de la capa con un tamaño de radio de la circunferencia circunscrita a la base comprendido entre 10nm y 1000 μm .

13.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la capa superior sellante de aislamiento óptico se fabrica en un material que se selecciona entre vidrio y polímero y tiene un espesor comprendido entre 100 y 1000 μm .

14.- Dispositivo según la reivindicación 13, caracterizado porque la capa superior incluye una capa de un óxido conductor eléctrico transparente.

15.- Dispositivo según la reivindicación 13, caracterizado porque la capa superior incluye un electrodo metálico.

16.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque presenta entre 1 y 100 puertos de entrada y salida para la inyección de fluidos.

17.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque presenta entre 1 y 100 microcanales en forma de V para el transporte de fluidos hasta la entrada de los nanocanales.

5 **18.-** Dispositivo según la reivindicación 17, caracterizado porque los microcanales tienen una anchura comprendida entre 1 y 500 μm y una profundidad comprendida entre 0,5 y 50 μm .

10 **19.-** Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado porque los materiales de las distintas capas que lo conforman se seleccionan en función de la longitud de onda del emisor de forma que:

- el índice de refracción del material utilizado para el sustrato es arbitrario por estar minimizada su influencia sobre la luz emitida.
- el índice de refracción del material utilizado para la capa inferior es $< 1,5$ para la longitud de onda del emisor.
- 15 • el índice de refracción del material utilizado para la capa central es $> 1,5$ para la longitud de onda del emisor.

20 **20.-** Dispositivo según la reivindicación 19, caracterizado porque el material de la capa central presenta en la región espectral del emisor un coeficiente de absorción k en el índice de refracción complejo $n = n + ik$ cuyo valor está comprendido entre 0 y 1.

21.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque se elimina el sustrato que otorga rigidez mecánica al dispositivo.

25 **22.-** Procedimiento de fabricación de un dispositivo según las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque comprende:

- una etapa en la que se proporciona un sustrato plano a escala submicrónica con una capa de un material que presenta un coeficiente de absorción k comprendido entre 0 y 1 y un índice de refracción inferior a 1,5 en el rango de longitud de onda del fluoróforo empleado,
- 30 • una etapa en la que se proporciona una capa con un coeficiente de absorción k comprendido entre 0 y 1 y un índice de refracción superior a 1,5 en el rango de longitud de onda del fluoróforo empleado,

- una etapa de formación mediante litografía de nanoimpresión de una red periódica de cavidades de tamaño inferior a la micra sobre la superficie de dicho sustrato y de uno o varios canales para transportar un fluido también de dimensiones submicrónicas,
- una etapa de deposición de un material transparente sobre dichas cavidades con el fin de sellarlas por su parte superior.

5

23.- Uso de un dispositivo según las reivindicaciones 1 a 21 para la detección de una única molécula en situación de nanoconfinamiento y en régimen dinámico que comprende las siguientes etapas:

- 10 • introducción del fluido que contiene las moléculas a través de los puertos de entrada del dispositivo.
- circulación de las moléculas a través de los microcanales mediante presión o campo eléctrico hasta llegar a la zona de entrada a los nanocanales.
- penetración y difusión de las moléculas en los nanocanales en ausencia de excitación
- 15 externa
- excitación del fluoróforo ligado a las moléculas a través de la iluminación con fuente de luz monocromática o policromática.
- detección de la emisión del fluoróforo a través de una cámara CCD.

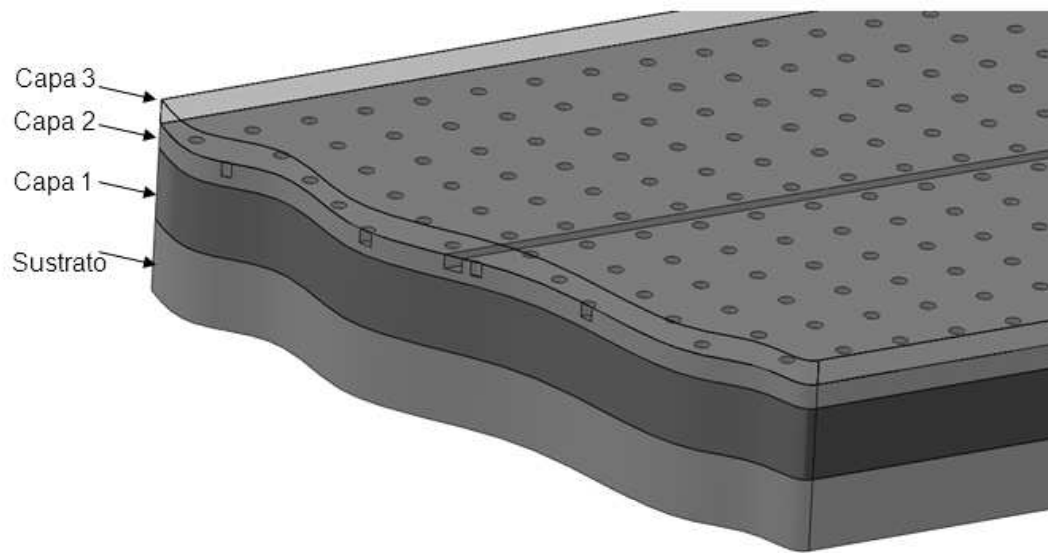


Fig. 1

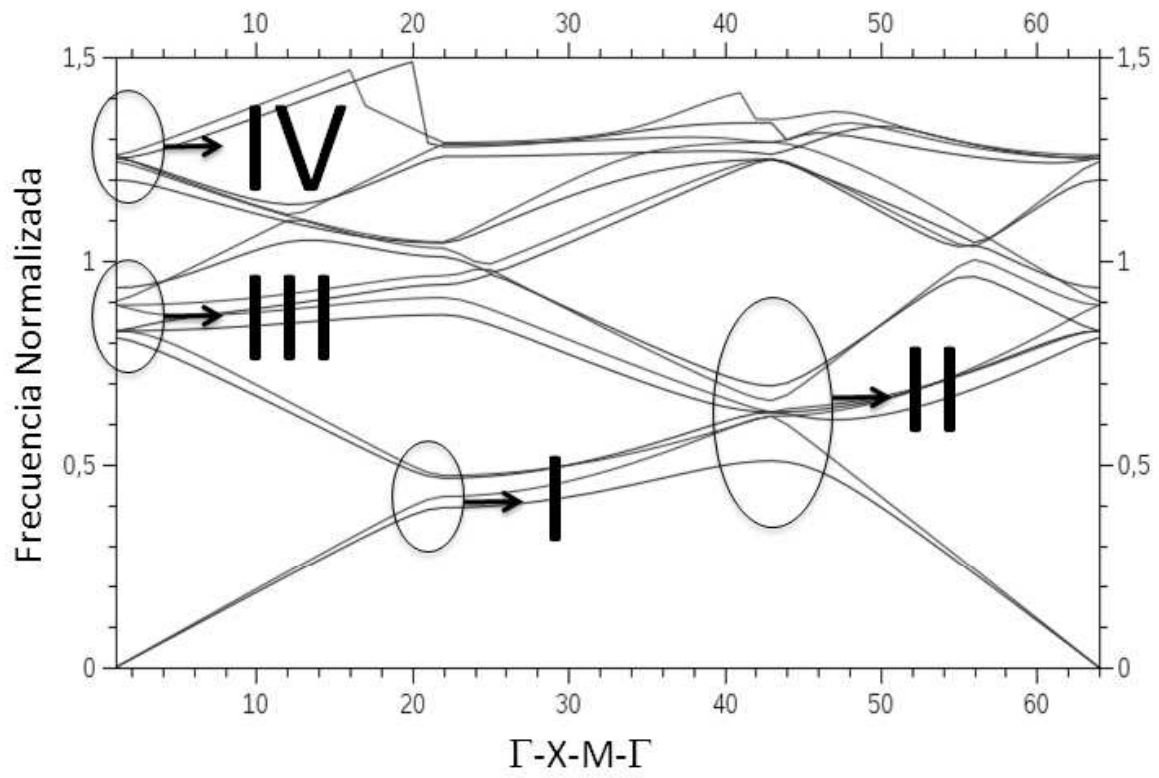


Fig. 2

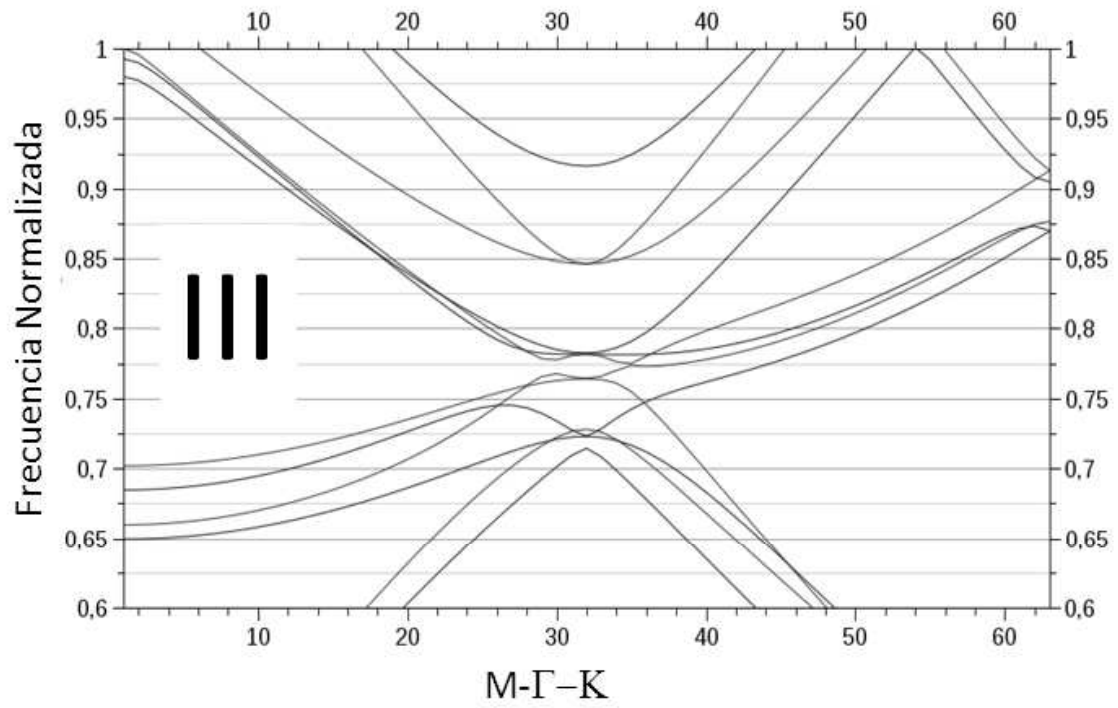


Fig. 3

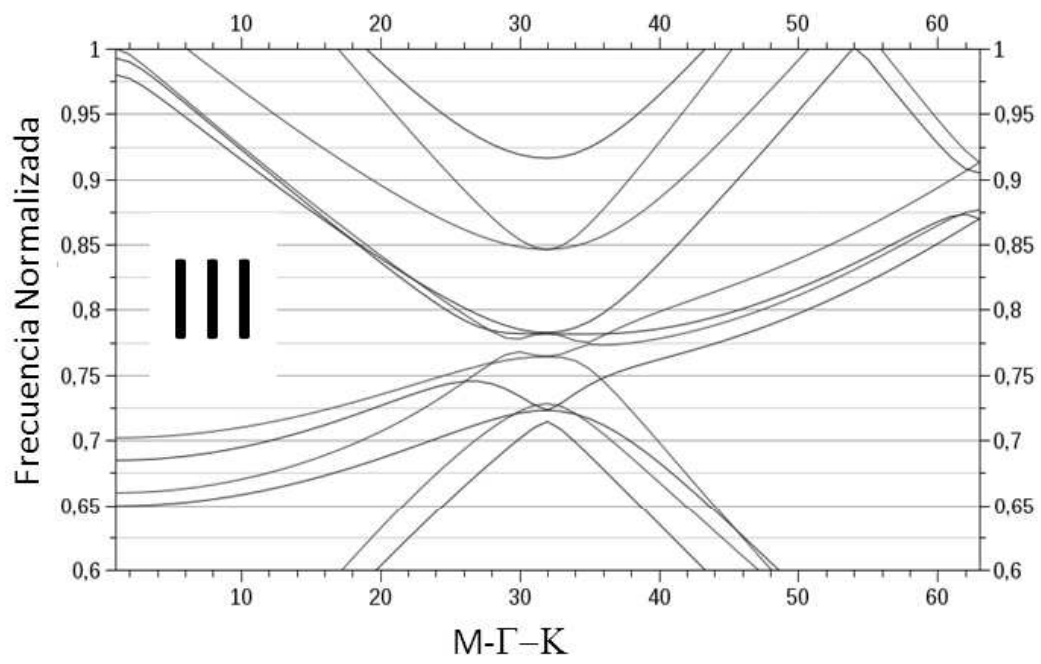


Fig. 4

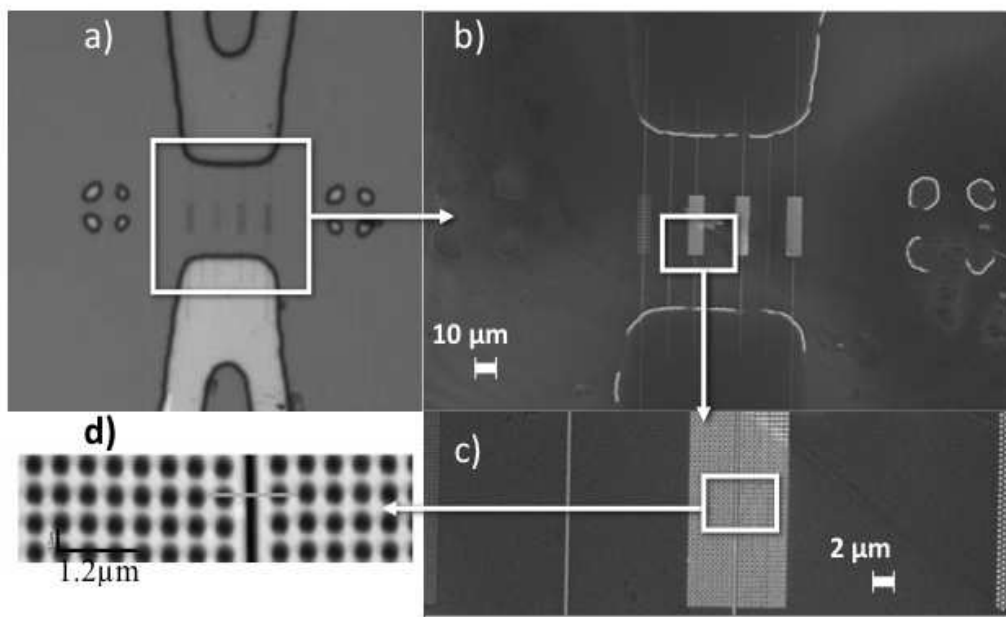


Fig. 5

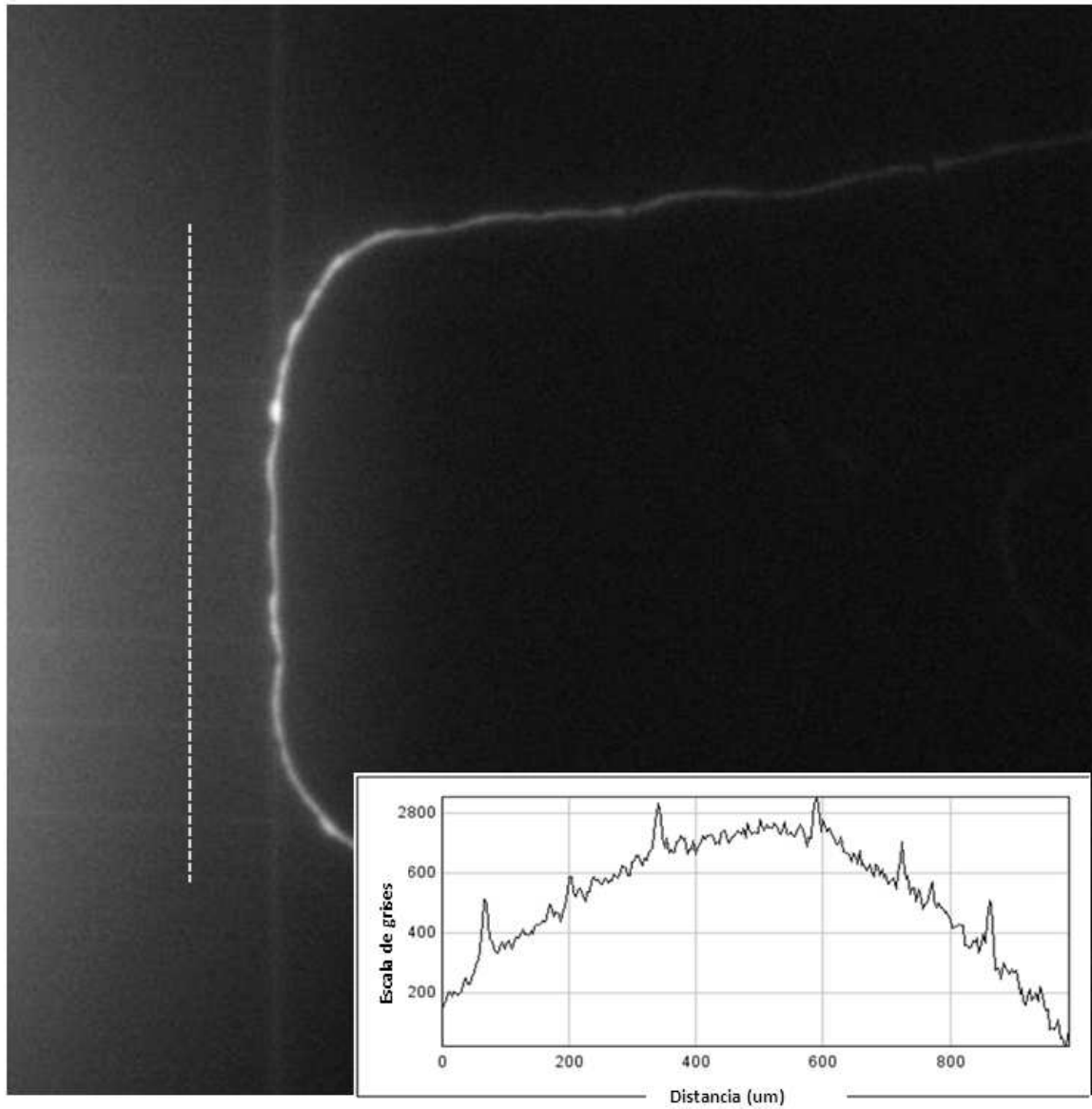


Fig. 6

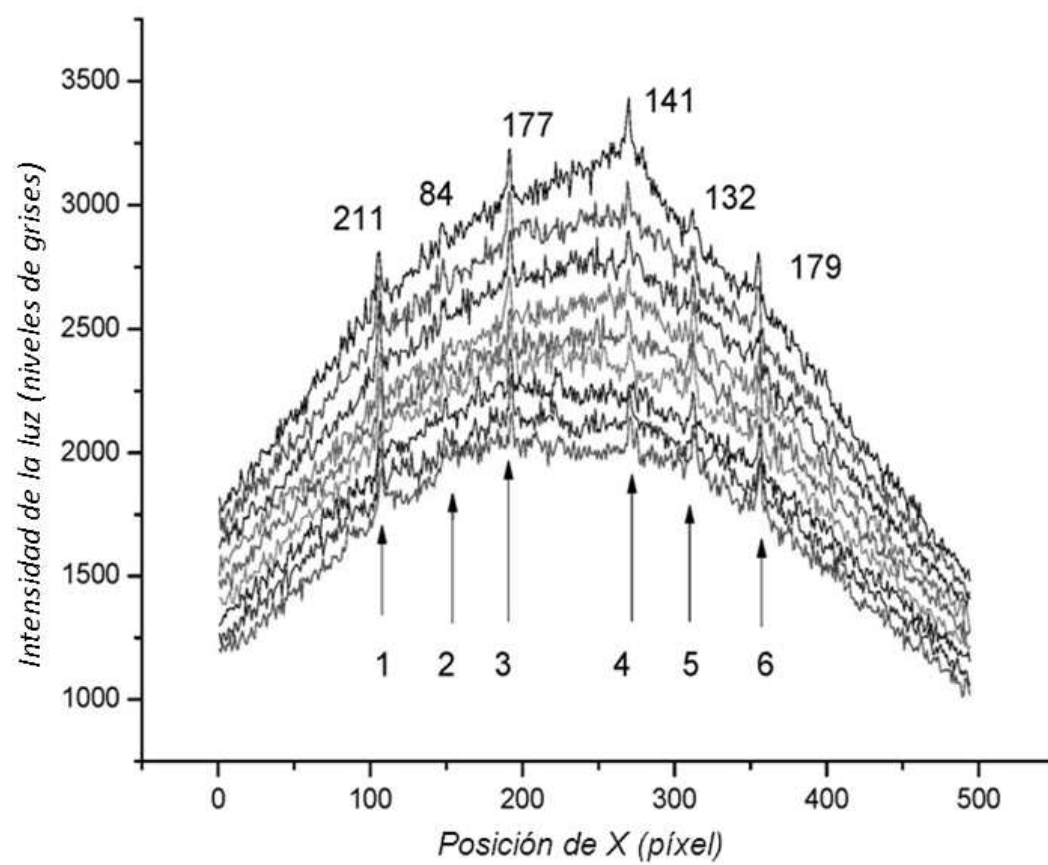


Fig. 7